

5

## **Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial und Probensammlung**

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial sowie eine Probensammlung aus isoliertem biologischen Probenmaterial.

15

Aus zahlreichen Veröffentlichungen, beispielsweise Alon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Bd. 96 (1999) 6745-6750; Zou et al., Oncogene 21 (2002) 4855-4862; Nottermann et al., Cancer Research 61 (2001) 3124-3130, Sorlie et al., PNAS 98 (2001) 10869-10874, ist bekannt, daß isolierte biologische Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei etwa  $-170^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können.

20

Bei diesen bekannten Verfahren ist nachteilig, daß die biologischen Gewebeproben nicht unter standardisierten Bedingungen isoliert, aufbereitet, konserviert und gelagert werden. Aufgrund der fehlenden Standardisierung sind experimentelle Ergebnisse, die bei Experimenten mit verschiedenen isolierten biologischen Proben erhalten werden, untereinander nicht ausreichend vergleichbar.

25

Die zwischen Isolation von biologischem Probenmaterial aus seiner natürlichen Umgebung und Konservierung oder Einfrieren des biologischen Probenmaterials verstreichende Zeit hat einen wesentlichen Einfluß auf den biochemischen Zustand bzw. die Qualität des isolierten biologischen Probenmaterials.

30

Das einem Menschen entnommene biologische Probenmaterial, beispielsweise Tumormaterial, verändert sich aufgrund der fehlenden Nährstoffversorgung durch

35

den Blutkreislauf. Beispielsweise kommt es zu einem Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere Ribonukleinsäuren, sowie von Proteinen. Auch kann es zu einer Modifizierung, beispielsweise zu Phosphorylierung und/oder Dephosphorylierung von zellulären Bestandteilen, insbesondere von Proteinen, kommen.

5

Das heißt, mit zunehmender Zeitdauer nach Isolation des biologischen Probenmaterials gibt das isolierte biologische Probenmaterial nicht mehr den biochemischen oder physiologischen Zustand vor der Entnahme aus der natürlichen Umgebung wieder.

10

Um bei experimentellen in vitro-Untersuchungen mit isoliertem biologischen Probenmaterial zu Ergebnissen zu kommen, die eine Aussage über die biochemischen, physiologischen und/oder molekularbiologischen in vivo-Verhältnisse zu lassen, ist wesentlich, daß das isolierte biologische Probenmaterial auch die in vivo-Verhältnisse wiedergibt.

15

Ein solches isoliertes biologisches Probenmaterial wäre beispielsweise ein wertvolles Untersuchungsmaterial bei der Wirkstoff- und Arzneimittelentwicklung auf dem Gebiet von Krebs- oder Stoffwechselerkrankungen.

20

Des weiteren wäre ein solches hochwertiges biologisches Probenmaterial auch sehr gut geeignet, um die molekularbiologischen und/oder pathobiochemischen Vorgänge in pathologischem biologischen Probenmaterial im Vergleich zu nichtpathologischem biologischen Probenmaterial zu untersuchen, um Erkenntnisse über die molekularen Ursachen von Erkrankungen, beispielsweise von Krebs- oder Stoffwechselerkrankungen, zu gewinnen.

25

Um die Relevanz von erhaltenen experimentellen Ergebnissen beurteilen zu können, müssen diese statistisch abgesichert sein. Insofern muß eine entsprechende Anzahl von experimentellen Untersuchungen mit isolierten biologischen Probenmaterialien verschiedenen Ursprungs durchgeführt werden. Hierbei ist Voraussetzung, daß die verschiedenen isolierten biologischen Probenmaterialien nach der Isolation unter standardisierten Bedingungen aufbereitet, konserviert und gelagert werden.

30

Es besteht mithin ein Bedarf an einem Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von biologischem Probenmaterial.

Des weiteren besteht ein Bedarf an einer Sammlung von biologischem Probenmaterial, das den biochemischen Zustand in seiner natürlichen Umgebung zuverlässiger wiedergibt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, wobei isoliertes biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist, gelöst.

Bevorzugte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen 2 bis 15 angegeben.

Die Aufgabe wird weiterhin durch eine Probensammlung, die isoliertes und gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 aufbereitetes biologisches Probenmaterial enthält, gelöst.

Die Entnahme bzw. Isolation des biologischen Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung, beispielsweise durch chirurgischen Eingriff beim Menschen, ist nicht Gegenstand der Erfindung. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erstellung einer Probensammlung aus isoliertem biologischen Probenmaterial folgt unmittelbar auf die Entnahme und kann von Laborpersonal ohne ärztliche Beaufsichtigung durchgeführt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und vor der Konservierung erfaßt und dokumentiert.

Die Erfassung der Beschaffenheit des isolierten biologischen Probenmaterials kann beispielsweise durch fotografische Dokumentation erfolgen. Des weiteren kann eine

medizinische oder wissenschaftliche Begutachtung und Bewertung des Zustands des isolierten biologischen Probenmaterials und Dokumentation der Bewertung erfolgen. Eine Erfassung der Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials unmittelbar nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung erlaubt eine umfassendere Beurteilung und Bewertung von zu einem späteren Zeitpunkt mit dem isolierten biologischen Probenmaterial durchgeführten Untersuchungen und/oder Experimenten.

Vorzugsweise weist das biologische Probenmaterial ein definiertes Volumen auf. Hierbei hat sich ein Volumen von etwa  $0,5 \text{ cm}^3$  bis etwa  $1 \text{ cm}^3$  als sehr geeignet erwiesen. Dabei ist es bevorzugt, mehrere biologische Probenmaterialien zu gewinnen, die in etwa das gleiche Volumen, beispielsweise etwa  $0,5 \text{ cm}^3$  und/oder etwa  $1 \text{ cm}^3$  aufweisen. Selbstverständlich kann das biologische Probenmaterial auch kleinere Volumina, beispielsweise  $1 \text{ mm}^3$  oder  $3 \text{ mm}^3$ , oder auch größere Volumina, beispielsweise  $2 \text{ cm}^3$  oder  $4 \text{ cm}^3$ , einnehmen.

Das biologische Probenmaterial kann unmittelbar nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und Erfassung der Beschaffenheit, beispielsweise durch digitale Photodokumentation, auf das gewünschte Probenvolumen mit einem Skalpell zugeschnitten werden. Nachfolgend können die Probenvolumina in geeignete Probenröhrchen, beispielsweise Kryoröhrchen, überführt werden. Die Kryoröhrchen können nachfolgend in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können auch in Paraffin eingebettet werden. Vor der Paraffineinbettung kann gegebenenfalls eine Entwässerung unter standardisierten Bedingungen erfolgen. Aus den eingebetteten Probenmaterialien können beispielsweise Gewebeschnitte für eine mikroskopische Untersuchung angefertigt werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung beträgt die definierte maximale Abweichung des definierten Zeitraums nicht mehr als etwa 10 %, vorzugsweise nicht mehr als etwa 5 %, bezogen auf den definierten Zeitraum.

Es hat sich gezeigt, daß die Einhaltung eines definierten Zeitraumes, gemessen von der Entnahme des biologischen Probenmaterials bis zur Konservierung und/oder

Lagerung des isolierten biologischen Probenmaterials, die Vergleichbarkeit der Qualität des isolierten biologischen Probenmaterials stark verbessert.

5 Bei Einhaltung standardisierter Bedingungen bei der Aufarbeitung der isolierten biologischen Probenmaterialien, insbesondere der Zeitdauer zwischen Entnahme und Konservierung und/oder Lagerung, weisen die gesammelten biologischen Probenmaterialien eine sehr gute Vergleichbarkeit auf.

10 Mithin können bei einem Vergleich des biochemischen und/oder physiologischen Zustandes der isolierten biologischen Probenmaterialien von beispielsweise gesunden bzw. nichtpathologischen Gewebeproben mit pathologischen Gewebeproben die Unterschiede auf die jeweilige Erkrankung oder Entartung zurückgeführt werden. Das heißt, bei einer standardisierten Aufarbeitung der isolierten biologischen Probenmaterialien sind die gegebenenfalls zwischen  
15 verschiedenen biologischen Probenmaterialien festzustellenden Unterschiede nicht auf das jeweilige Aufbereitungsverfahren bzw. eine unterschiedliche Zeitdauer der Aufarbeitung zurückzuführen, sondern ein Indiz für die molekularen Ursachen der jeweiligen Erkrankung oder Entartung.

20 Erfindungsgemäß ist bevorzugt, daß der definierte Zeitraum weniger als etwa 25 Minuten, vorzugsweise weniger als etwa 15 Minuten, beträgt. Weiterhin ist bevorzugt, daß der definierte Zeitraum etwa 12 Minuten beträgt. Noch bevorzugter beträgt der definierte Zeitraum etwa 10 Minuten. Selbstverständlich kann der definierte Zeitraum auch kürzer sein, beispielsweise 5 oder 8 Minuten.

25 Im Hinblick auf den Umstand, daß die Isolation von humanem biologischen Probenmaterial in einem Operationssaal zu erfolgen hat und die Aufarbeitung des isolierten biologischen Probenmaterials regelmäßig außerhalb des Operationssaals erfolgt, ist eine Verringerung der Zeitdauer, gemessen ab Isolation des biologischen  
30 Probenmaterials bis zur Konservierung des isolierten biologischen Probenmaterials, von weniger als fünf Minuten praktisch nicht durchführbar. Als sehr geeignet hat sich ein definierter Zeitraum von etwa 10 Minuten erwiesen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Weiterbildung erfolgt die Konservierung des isolierten biologischen Probenmaterials durch Kryokonservierung oder durch chemische Konservierung.

- 5 Unter „Konservierung“ wird im Sinne der Erfindung verstanden, daß der biochemische oder physiologische Zustand des isolierten biologischen Probenmaterials fixiert wird.

10 Die Kryokonservierung erfolgt vorzugsweise durch Eintauchen des isolierten biologischen Probenmaterials in ein Kältemedium und Einfrieren des biologischen Probenmaterials in einem Zeitraum von vorzugsweise wenigen Sekunden. Als Kältemedium wird vorzugsweise flüssiger Stickstoff verwendet. Bei dieser Vorgehensweise fallen die Konservierung und Lagerung des isolierten biologischen Probenmaterials zusammen.

15 Gemäß einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Konservierung unter Verwendung von chemischem Vernetzungsmittel. Die bevorzugt verwendeten Vernetzungsmittel besitzen reaktive Gruppen.

- 20 Unter „reaktiven Gruppen“ werden im Sinne der Erfindung chemische Funktionalitäten verstanden, die sich mit dem isolierten biologischen Probenmaterial chemisch umsetzen. Dabei können die reaktiven Gruppen des Vernetzungsmittels mit reaktiven Gruppen auf dem isolierten biologischen Probenmaterial reagieren. Vorzugsweise enthält das bei der Erfindung verwendete Vernetzungsmittel als  
25 reaktive Gruppen Aldehyd- und/oder Epoxidgruppen, die sich vorzugsweise mit Aminogruppen auf dem isolierten biologischen Probenmaterial umsetzen.

Die Vernetzungsmittel werden dabei vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, die aus Formaldehyd, Polyaldehyden, vorzugsweise Dialdehyden, Polyepoxid-  
30 verbindungen, vorzugsweise Di- und/oder Triepoxidverbindungen, und/oder Gemischen davon besteht.

Vorzugsweise wird als Dialdehyd Glutardialdehyd verwendet. Anstelle von Formaldehyd kann selbstverständlich auch Paraformaldehyd verwendet werden.

35

Als Diepoxidverbindungen können beispielsweise Polyalkylenglykoldiglycidylether, vorzugsweise Polyethylenglykoldiglycidylether, oder Alkandiolglycidylether, beispielsweise 1,6-Hexandiolglycidylether und/oder 1,4-Butandiolglycidylether, verwendet werden.

Als Polyglycidylverbindungen können beispielsweise Polyalkoholpolyglycidylether, beispielsweise Sorbitolpolyglycidylether, Glycerinpolyglycidylether, Pentaerythrolpolyglycidylether, Saccharidpolyglycidylether und Gemische davon verwendet werden.

Das isolierte biologische Probenmaterial kann nur durch Kryobehandlung oder nur durch chemische Konservierung konserviert werden. Selbstverständlich kann das isolierte biologische Probenmaterial zunächst mit chemischem Vernetzungsmittel oder Konservierungsmittel behandelt und nachfolgend einer Kryobehandlung unterworfen werden. Es ist aber auch möglich, das isolierte biologische Probenmaterial zunächst einer Kryobehandlung und Lagerung unter flüssigem Stickstoff oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt einer chemischen Konservierung durch Behandlung mit chemischem Vernetzungsmittel oder Konservierungsmittel zu unterwerfen.

Bevorzugt ist das isolierte biologische Probenmaterial humanes Gewebe. Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete biologische Probenmaterial kann grundsätzlich jedes biologische Material sein, mit dem eine Sammlung mit isoliertem biologischen Probenmaterial erstellt werden soll.

Besonders eignet sich tumorfreies Gewebe, Tumorgewebe und/oder Fettgewebe bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Des weiteren ist bevorzugt, daß das Tumorgewebe zentrales oder peripheres Tumorgewebe ist. Als Tumorgewebe kann beispielsweise Gewebe von Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, Magenkarzinom oder Cervixkarzinom verwendet werden.

Der Vergleich des biochemischen und/oder physiologischen Zustandes von tumorfreiem Gewebe, zentralem sowie peripherem Tumorgewebe aus der erfindungsgemäßen Probensammlung bzw. nach dem erfindungsgemäßen

Verfahren aufbereitete isolierte biologische Probenmaterialien kann die molekularen Unterschiede, beispielsweise von Genaktivitäten, Expressionsmustern, Expressionsprofilen, aktivierten Proteinen, insbesondere zellulären Tumorfaktoren, Enzymen, etc., bei experimentellen Untersuchungen aufzeigen.

5

Die unterschiedlichen DNA-, RNA- und/oder Protein-Aktivitäten in den isolierten biologischen Proteinmaterialien können beispielsweise in Microarray-Analysen, beispielsweise auf sogenannten Biochips (DNA-Arrays oder Protein-Arrays), untersucht werden.

10

Aus diesem Vergleich von unter standardisierten Bedingungen aufbereitetem biologischen Probenmaterial lassen sich mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe und/oder Arzneimittel bei der Behandlung von Krebs oder Stoffwechselerkrankungen ermitteln. Insbesondere ist unter Verwendung einer Vielzahl von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufbereiteten isolierten biologischen Probenmaterialien eine statistische Validierung der experimentellen Ergebnisse möglich.

15

20

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung werden dem isolierten biologischen Probenmaterial Datensätze zugeordnet.

25

Die Datensätze enthalten insbesondere Informationen über die isolierten Probenmaterialien. In der Regel wird das isolierte biologische Probenmaterial vor oder nach der Konservierung mehrfach geteilt und separat voneinander aufbewahrt. Ein Teil des Probenmaterials kann dann unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren, beispielsweise auf Proteinebene und/oder mRNA-Ebene, analysiert werden. Diese Daten erlauben eine Aussage über den Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszustand von Genen, mRNAs und/oder Proteinen. Unter Verwendung dieser Daten kann mithin eine Art Aktivierungsprofil oder Expressionsprofil des isolierten biologischen Probenmaterials erstellt werden.

30

Die Zuordnung der Datensätze zu den isolierten biologischen Probenmaterialien kann beispielsweise über Identifikationsnummern des jeweiligen isolierten biologischen Probenmaterials in einer Computer-gestützten Datenbank erfolgen.

35



Vorzugsweise umfassen die Datensätze ferner Informationen über die Anamnese, Medikation, Narkose, den Operationsverlauf, klinische Parameter und/oder Nachsorgedaten.

5 Die Datensätze enthalten vorzugsweise zusätzlich Informationen über klinisch-chemische Diagnosen von Blut-, Stuhl-, Urin-, Sputum-, Liquor cerebrospinalis-Proben, etc., die vor und/oder nach Isolation des jeweiligen biologischen Probenmaterials vom Patienten gewonnen wurden. Somit können die Datensätze Informationen über Blutgruppe, Blutbild, Gerinnungswerte, Tumormarker,  
10 Leberwerte, Nierenwerte, Serum-Elektrolytwerte, etc. enthalten.

Des weiteren können die Datensätze Informationen über vor und/oder nach der Isolation von biologischem Probenmaterial dem Patienten verabreichte Medikamente enthalten.

15 Ebenfalls können die Datensätze Informationen bzgl. der Anamnese, beispielsweise Eß- und Lebensgewohnheiten wie Appetit, Aversionen, Allergien, Vorerkrankungen, Kindererkrankungen, Infektionserkrankungen, Tropenerkrankungen, frühere Krebserkrankungen, Schlafgewohnheiten, Ausscheidungsgewohnheiten von Stuhl  
20 und Urin, Alkohol-, Nikotin- und/oder Drogenkonsum, Beschwerden und Befindlichkeiten, Symptome, Medikamentendosen und Unverträglichkeiten von Medikamenten, etc., umfassen.

Des weiteren können die Datensätze Informationen über den zeitlichen Verlauf der  
25 Entnahme des biologischen Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung umfassen. Vorzugsweise wird als Beginn des zeitlichen Ablaufs die Abtrennung bzw. Herauslösung des Gewebes von Menschen verwendet. Bei Isolation von Kolongewebeproben ist der Zeitpunkt der Durchtrennung des proximalen und distalen Endes des biologischen Probenmaterials der Startpunkt der Zeitmessung.

30 Insbesondere können weitere Informationen bzgl. des isolierten biologischen Probenmaterials dokumentiert werden, beispielsweise Angaben zu Größe des isolierten Gewebematerials, beispielsweise die Tumorgroße.

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können dann, wie oben erläutert, durch Kryobehandlung beispielsweise in flüssigem Stickstoff konserviert und unter flüssigem Stickstoff oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei etwa  $-80^{\circ}\text{C}$ , aufbewahrt werden.

5

Die isolierten biologischen Probenmaterialien können aber auch zunächst chemisch konserviert oder fixiert und, falls erwünscht, nachfolgend einer Kryobehandlung, beispielsweise durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff, unterworfen werden und schließlich bis zur weiteren Verwendung beispielsweise unter flüssigem Stickstoff oder in einem Gefrierschrank, beispielsweise bei etwa  $-80^{\circ}\text{C}$ , aufbewahrt werden.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, das unter standardisierten Bedingungen aufgearbeitet wurde, wobei jedem isolierten biologischen Probenmaterial eine Vielzahl von klinisch relevanten Daten zugeordnet werden kann. Die Kombination von standardisiertem Probenmaterial und klinisch relevanten Daten ist äußerst wertvoll für die Wirkstoff- oder Arzneimittelforschung.

15

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Probensammlung mehr als 100, vorzugsweise mehr als 500, noch bevorzugter mehr als 1000 isolierte biologische Probenmaterialien.

20

#### Beispiel 1: Erstellung einer Sammlung von isoliertem Colongewebe

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial anhand von isoliertem Colontumorgewebe veranschaulicht. Das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch nicht auf Colontumorgewebe bzw. Colongewebe beschränkt und kann selbstverständlich auch mit anderem Körpergewebe, beispielsweise Bronchialgewebe, Mammagewebe, etc., durchgeführt werden.

25

30

Zur Erstellung von dem isolierten biologischen Probenmaterial zugeordneten Datensätzen wurden neben den Anamnesedaten sowie weiteren klinisch-chemischen Parametern des Patienten, beispielsweise Blut-, Urin-, Liquor-, Sputumanalysen, etc., auch der zeitliche Ablauf bis zur und einschließlich der

35

Entnahme des biologischen Probenmaterials dokumentiert. Mithin wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren unter standardisierten Bedingungen gewonnenes Probenmaterial zur Erstellung einer Probensammlung bereitgestellt. Darüber hinaus wird vorzugsweise eine Vielzahl klinisch relevanter Informationen über den

5 Patienten, dem das Probenmaterial entnommen wurde, sowie über die Gewinnung des Probenmaterials selbst als auch Analysedaten des isolierten Probenmaterials in Form von Datensätzen dem isolierten biologischen Probenmaterial zugeordnet und gespeichert.

10 Mithin stehen beispielsweise der Wirkstoff- bzw. Arzneimittelforschung zum einem eine Vielzahl von innerhalb einer äußerst kurzen Zeit, beispielsweise 10 Minuten, und unter standardisierten Bedingungen gewonnene biologische Probenmaterialien sowie zum anderen mit dem jeweiligen Probenmaterial verknüpfte spezifische Informationen zur Verfügung.

15 Die bei der Wirkstoffforschung mit verschiedenen isolierten Gewebeproben, beispielsweise Colongewebeproben, erhaltenen gegebenenfalls unterschiedlichen Ergebnisse können eventuell vor dem Hintergrund der weiter vorliegenden Informationen verstanden, erklärt und/oder gedeutet werden. Die mit dem

20 erfindungsgemäßen Verfahren erstellte erfindungsgemäße Proben- und Datensammlung ist insbesondere für die Wirkstoffforschung der Pharmaindustrie ein äußerst wertvolles Werkzeug.

25 Den Zeitpunkten vor der Isolation des Probenmaterials ist in der untenstehenden Tabelle 1 ein Minuszeichen vorangestellt. Die Entnahme selbst ist nicht Teil des erfindungsgemäßen Verfahrens. Vielmehr beginnt das erfindungsgemäße Verfahren unmittelbar nach der erfolgten Isolation des biologischen Probenmaterials. Den Zeitpunkt nach der erfolgten Isolation ist in der Tabelle 1 ein Pluszeichen vorangestellt.

Tabelle1: Zeitverlauf von der Entnahme bis zur Konservierung von Colongewebe

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Handlung</b>
5	
-77 min	Beginn der Narkose des Patienten
-61 min	Blutabnahme
-45 min	Beginn der Operation
-38 min	Urinabnahme
10	
-14 min	Abbindung der Mesenterica inferior
- 7 min	Abbindung der unteren Arkade
- 5 min	Abbindung der oberen Arkade
- 3 min	Durchtrennung des distalen Endes des Resektats (Colongewebe)
0 min	nach Durchtrennung des proximalen Endes des Resektats
15	
+ 1 min	Resektat wird entlang des Darmverlaufs mit einer Schere aufgeschnitten, wobei der Tumor vorzugsweise nicht durchschnitten wird.
+1 bis 5 min	Das Resektat sowie der Tumor werden vorzugsweise mit einer digitalen Kamera photographiert. Von dem Tumor wird eine Großaufnahme angefertigt.
20	
+ 5 min	Aus dem Resektat und dem Tumor werden Proben entnommen. Die Proben umfassen beispielsweise gesundes Gewebe, Fettgewebe, peripheres Tumorgewebe und zentrales Tumorgewebe. Das gesunde Gewebe wird mindestens 5 cm von dem Tumor entfernt aus dem Resektat entnommen. Die Proben werden zerteilt, so daß das Volumen vorzugsweise etwa 0,5 cm <sup>3</sup> beträgt. Die zerteilten Proben werden in Probenröhrchen überführt
25	
+ 10 min	Konservierung der Probenmaterialien in den Röhrchen:
30	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder</li> <li>- durch Zugabe von 10 ml 3,5 % Formaldehydlösung oder</li> <li>- durch Zugabe von 10 ml 5,5 Gew.-% Glutaraldehydlösung</li> </ul>
35	
	Von den durch Zerteilung der isolierten Probenmaterialien erhaltenen Proben wird vorzugsweise jeweils ein Drittel nach jedem der vorstehenden Konservierungsverfahren konserviert und nachfolgend

gelagert. Bei Konservierung mittels Formaldehyd oder Glutaraldehyd wird das biologische Probenmaterial vorzugsweise über einen definierten Zeitraum, beispielsweise zehn oder 24 Stunden, bei Zimmertemperatur (z.B. 25°C) stehen gelassen. Mit Zugabe der Konservierungslösung, d.h. Formaldehydlösung, Glutaraldehydlösung oder flüssigem Stickstoff, ist das erfindungsgemäße Verfahren in zeitlicher Hinsicht abgeschlossen.

Beispiel 2: Nachweis der Veränderung von biologischem Probenmaterial über die Zeit Isolation aus der natürlichen Umgebung

Als Nachweis für die Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde die Proteinzusammensetzung von Darmgewebeproben in definierten zeitlichen Abständen nach Entnahme aus dem Patienten mittels SELDI-MS (Surface-enhanced Laser Desorption Ionisation-Massenspektrometrie) untersucht.

In Fig.1 ist das Ergebnis von SELDI-MS-Analysen von Dickdarmgewebeproben gezeigt. Das Probenmaterial wurde dabei 3 min, 5 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min sowie 30 min nach Entnahme aus dem Patienten in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Proben wurden nachfolgend gemäß Herstellerangaben (Firma CIPHERGEN, Göttingen, Deutschland) aufgearbeitet und mittels SELDI-MS analysiert.

In Fig. 1 ist das jeweils erhaltene Massenspektrum gezeigt. Von dem in der rechten Eingrenzung gezeigten Teil des Massenspektrums ist eine vergrößerte Überlagerung der Massenspektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entnahme rechts von den Massenspektren dargestellt. In der Überlagerung des Ausschnitts der erhaltenen Massenspektren sind die jeweiligen Zeitpunkte des Einfrierens des Probenmaterials in flüssigem Stickstoff angegeben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass es zu einer zeitlichen Veränderung bei der Proteinzusammensetzung bei den isolierten Resektaten, den isolierten Colongewebeproben, zwischen Resektion und Einfrieren innerhalb von Minuten kommt. Die zeitliche Veränderung kann beispielsweise auf eine Hoch- und/oder Runterregulierung von Proteinen, beispielsweise infolge einer Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse belegen die große Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens, nämlich der Standardisierung der Aufarbeitung der isolierten biologischen Probenmaterialien, bei der Erstellung einer Sammlung von  
5 biologischem Probenmaterial.

5

### Patentansprüche

- 10 1. Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischem Probenmaterial, wobei isoliertes biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung  
15 verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,  
20 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Beschaffenheit des biologischen Probenmaterials nach der Isolation aus seiner natürlichen Umgebung und vor der Konservierung erfaßt und dokumentiert wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2,  
25 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß das biologische Probenmaterial ein definiertes Volumen aufweist.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,  
30 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die definierte maximale Abweichung des definierten Zeitraums nicht mehr als etwa 10 %, vorzugsweise nicht mehr als etwa 5 %, bezogen auf den definierten Zeitraum, beträgt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,  
35 **dadurch gekennzeichnet,**

daß der definierte Zeitraum weniger als etwa 25 Minuten, vorzugsweise weniger als etwa 15 Minuten, beträgt.

- 5 6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der definierte Zeitraum etwa 12 Minuten beträgt.
- 10 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der definierte Zeitraum etwa 10 Minuten beträgt.
- 15 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Konservierung durch Kryokonservierung oder durch chemische Konservierung erfolgt.
- 20 9. Verfahren gemäß Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß bei der chemischen Konservierung Vernetzungsmittel mit reaktiven Gruppen verwendet werden.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Vernetzungsmittel aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Formaldehyd, Polyaldehyden, vorzugsweise Dialdehyden, Polyepoxidverbindungen, vorzugsweise Di- und/oder Triepoxidverbindungen, und/oder Gemischen davon besteht.
- 30 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das isolierte biologische Probenmaterial humanes Gewebe ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**



daß das humane Gewebe tumorfreies Gewebe, Tumorgewebe und/oder Fettgewebe ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12,  
5 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß das Tumorgewebe zentrales oder peripheres Tumorgewebe ist.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13,  
10 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß dem Probenmaterial Datensätze zugeordnet werden.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14,  
15 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Datensätze Informationen über die Anamnese, Medikation, Narkose, Operationsverlauf, klinische Parameter und/oder Nachsorgedaten umfassen.
16. Biologische Probenmaterial-Sammlung, die isoliertes und gemäß dem  
20 Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 aufbereitetes biologisches Probenmaterial enthält.

5

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erstellung einer Sammlung von isoliertem biologischen Probenmaterial, wobei isoliertes biologisches Probenmaterial innerhalb eines definierten Zeitraums nach Isolation des Probenmaterials aus seiner natürlichen Umgebung konserviert und nachfolgend gelagert wird und wobei der definierte Zeitraum zwischen Isolation und Konservierung verschiedener Probenmaterialien eine definierte maximale Abweichung aufweist. Des weiteren betrifft die Erfindung eine Sammlung von biologischem Probenmaterial.

15

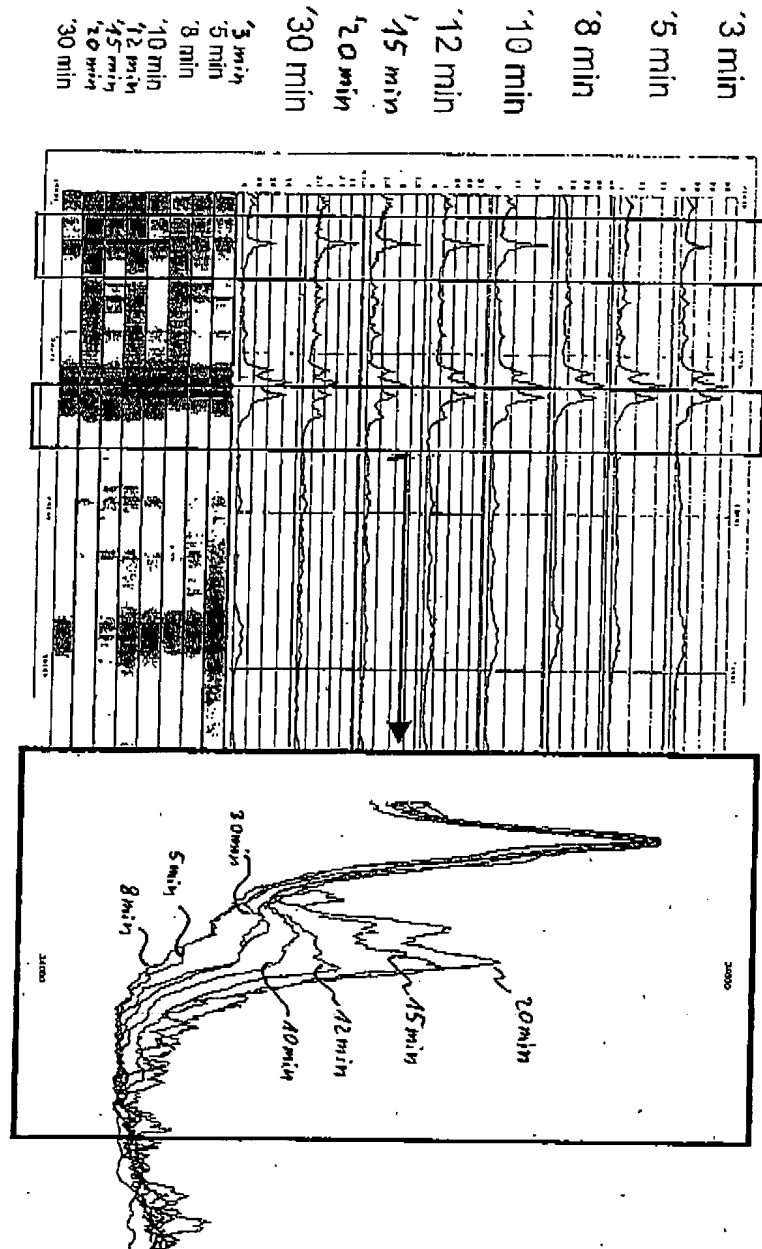


Fig. 1